

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. W. Wilbrandt

Curarewirkungen am perfundierten Froschschenkelpräparat

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

Vorgelegt von
JÜRGEN RAAFLAUB
von Saanen, Kt. Bern

1950
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. W. Wilbrandt

Curarewirkungen am perfundierten Froschschenkelpräparat

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

Vorgelegt von
JÜRGEN RAAFLAUB
von Saanen, Kt. Bern

1950
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. *W. Wilbrandt* von der
medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 5. Juli 1950

Der Dekan der medizinischen Fakultät
Prof. Dr. *C. Hallauer*



Sonderabdruck aus «*Helv. Physiol. et Pharm. Acta*»
Vol. 8, Fasc. 1, 1950

In Anbetracht der steigenden Aktualität, die das Curare in der klinischen Medizin erlangt hat, und der Möglichkeit, Substanzen mit Curarewirkung zu synthetisieren, die den natürlichen Curareprodukten gleichwertig oder überlegen sind (1), haben Methoden, mit denen pharmakologische Effekte an der motorischen Endplatte quantitativ erfaßt werden können, an Bedeutung zugenommen. Am Kaninchen wurde die Head-drop-Methode ausgearbeitet, die jedoch nicht frei von Nachteilen ist (2). Unlängst sind Curareversuche mit dem isolierten Rattenzwerchfellpräparat beschrieben worden (3). Unsere Methode geht von der Perfusion isolierter Extremitäten nach Trendelenburg aus, vorderhand an Kaltblütlern. Die isotonisch registrierten Kontraktionen des alternierend direkt und indirekt gereizten Sartoriusmuskels lassen Wirkung und Endplattenspezifität eines perfundierten Pharmakons unmittelbar erkennen.

Methode

Nach der üblichen Präparation nach Laewen-Trendelenburg wird das distale Sartoriusende bloß einige Millimeter lospräpariert, wodurch einerseits die Muskelkontraktionen isotonisch registrierbar werden, anderseits der Großteil des Sartorius durch die Blutstromwege perfundierbar bleibt. Der konstante Perfusionsdruck (Prinzip der Mariotteschen Flasche) beträgt in der Regel 20–30 cm H₂O. Der Sartorius wird durch supramaximale Kondensatorentladungen alternierend direkt und indirekt gereizt. Abb. 1 gibt das Schaltschema wieder. I, II und III sind dreipolige Quecksilberkontaktröhren. Sie werden durch zwei auf einer gemeinsamen, rotierenden Axe A fixierte Exzenter E₁ und E₂ betätigt (Abb. 2). Der Exzenter E₁ bewirkt Ladung und Entladung des Kondensators C, während der Exzenter E₂ die Kondensatorentladungen abwechselungsweise den Muskelelektroden ME und den Nerven Elektroden NE zuführt. Die von der Tourenzahl der Axe A abhängige Reizfrequenz betrug in unseren Versuchen durchwegs 1 Reiz in 9 Sek. Die direkt ausgelösten Kontraktionen können daher gleichzeitig als Zeitmarke (alle 18 Sek.) dienen.

Als Nachteil der Methode seien die beim Frosch schwer vermeidbaren Ödeme erwähnt, die öfters zu einer unvollständigen Reversibilität der Effekte führen. Ferner gibt es Präparate, bei denen trotz gut laufender Perfusion die erwarteten Effekte an der motorischen Endplatte nicht oder nur sehr träge eintreten, ob infolge Thrombosierung der Sartoriusgefäße oder infolge ungenügender Kapillarisation, bleibe dahingestellt.

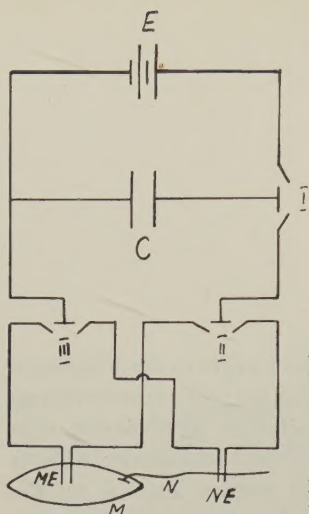


Abb. 1.

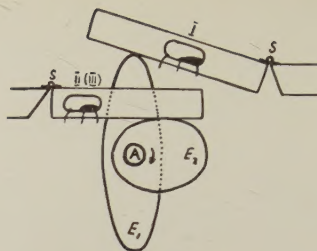


Abb. 2.

Abb. 1. Schaltschema der Reizapparat. E = Akkumulator; C = Kondensator; I, II, III = dreipolige Quecksilberkontakttröhen; ME = Muskelelektroden; NE = Nervenelektroden; M = Muskel; N = Nerv.

Abb. 2. Vorrichtung zur Betätigung der Quecksilberkontakttröhen I, II, III (s. Abb. 1 und Text). E₁, E₂ = Exzenter; A = Axe; I, II, III = Quecksilberkontakttröhen; S = Scharnier.

Ergebnisse

a) d-Tubocurarin

Untersucht wurde vor allem das d-Tubocurarinchlorid¹. Abb. 3 zeigt das

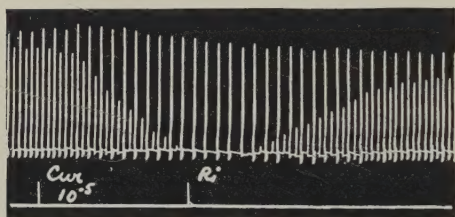


Abb. 3. Totale Curarisierung durch d-Tubocurarin 10^{-5} . Auswaschen mit Ringer.

Beispiel einer totalen Curarisierung bei einer d-Tubocurarin-konzentration von 10^{-5} . Man erkennt, daß innerhalb von 3 bis 4 Minuten die indirekten Hubhöhen auf Null abfallen, während die direkten Hubhöhen unverändert bleiben. Mit Ringersind die indirekten Kontraktionen, meist innerhalb von ca. 6 Minuten, regenerierbar.

Werden Curarelösungen mit abgestuft zunehmenden Konzentrationen zur Perfusion verwendet, dann resultiert eine entsprechend zunehmende partielle Curarisierung (Abb. 5). Eine graphische Auswertung solcher Versuche ist in Abb. 4 für drei verschiedene Froschpräparate dargestellt. Die Mittelwertskurve ergibt eine angenäherte lineare Abhängigkeit der Wirkung vom Logarithmus der Konzentration. Bei Konzentrationen mit weniger als 30% Hemmung stellte sich das Wirkungs-gleichgewicht so langsam ein, daß auf ihre Einbeziehung bei der graphischen Auswertung verzichtet werden mußte.

¹ Im Handel als Tubarine (Burroughs and Wellcome, London).

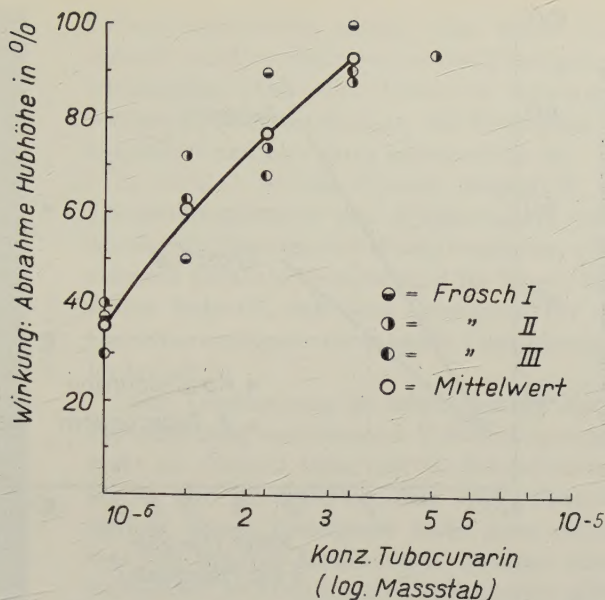


Abb. 4. Angenähert lineare Abhängigkeit der Wirkung (Abnahme der Hubhöhe in %) vom Logarithmus der Konzentration d-Tubocurarin.

b) Vergleichende Wirksamkeitsbestimmung

Es ist nun möglich, verschiedene Curarepräparate quantitativ miteinander zu vergleichen. Als Beispiel sei der Vergleich von d-Tubocurarin mit Kondrocurare² angeführt. Im Versuch der Abb. 5 wurden nacheinander d-Tubocurarin und Kondrocurare geprüft. Die graphische Auswertung zweier solcher Versuche (Abb. 5a) ergibt, daß d-Tubocurarin $\frac{10}{2,0}$ bzw. $\frac{10}{2,2}$ mal so stark wirkt als Kondrocurare. Danach ist also d-Tubocurarin ungefähr fünfmal wirksamer als Kondrocurare. Es ist jedoch selbstverständlich,

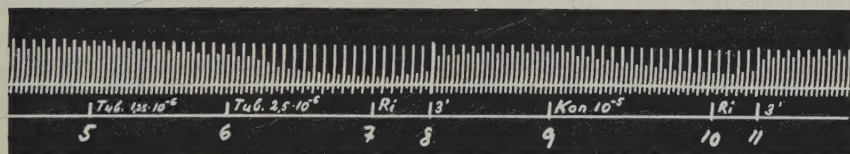


Abb. 5. Partielle Curarisierung durch d-Tubocurarin $1, 25 \cdot 10^{-6}$, d-Tubocurarin $2,5 \cdot 10^{-6}$ und Kondrocurare 10^{-5} .

² Kondrocurare, ein Reinalkaloid aus Chondrodendron plathyphyllum, wird hergestellt von der Firma Instituto Vital Brazil, Niteroi, Brasilien. Chemisch handelt es sich um den Dimethyläther des Methylbebeerins. Kondrocurare enthält demnach zwei Methylgruppen mehr als d-Tubocurarin.

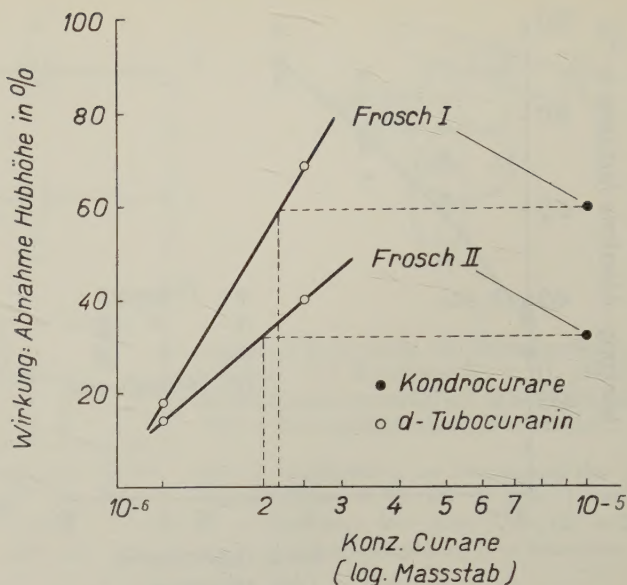


Abb. 5a. Graphische Auswertung von zwei vergleichenden Wirksamkeitsbestimmungen von Kondrocurare ● mit d-Tubocurarin ○ (s. auch Abb. 5). Die Kondrocurarekonzentration von 10^{-5} entspricht in ihrer Wirksamkeit (= Abnahme der Hubhöhe in %) ungefähr der d-TubocurarinKonzentration von $2 \cdot 10^{-6}$. Tubocurarin ist demnach fünfmal wirksamer als Kondrocurare.

daß diese am Frosch gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf Warmblütler übertragen werden dürfen³.

c) Curare-Prostigmin-Antagonismus

Der bekannte Curare-Prostigmin-Antagonismus ist mit der beschriebenen Methodik darstellbar. Prostigmin kann eine totale Curarisierung trotz weiterlaufender Perfusion mit unveränderter Curarekonzentration teilweise aufheben, wie aus Abb. 6a hervorgeht. Die notwendige Minimalkonzentration liegt bei $2 \cdot 10^{-6}$. Eine Steigerung der Prostigminkonzentration bis auf $2 \cdot 10^{-5}$ führt zu keiner deutlicheren Wirkung, als sie mit der bereits maximal wirkenden Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}$ zu erzielen ist. Die Prüfung der Reversibilität der Prostigminwirkung hat ergeben, daß Prostigmin innerhalb der üblichen Versuchszeiten praktisch nicht auswaschbar ist. Dies ergibt sich daraus, daß eine Curarekonzentration, die eine totale Curarisierung bewirkt (Abb. 6a), nach kurzdauernder Prostigminapplikation und anschließendem Auswaschen mit Ringer (Abb. 6a) nur mehr zu einer partiellen Curarisierung führt (Abb. 6b). Wenn durch Erhöhung der

³ Brieflich teilte uns O. V. Brazil, Niteroi (Brasilien), mit, daß Kondrocurare am Menschen so wirksam sei wie Tubarine.



Abb. 6b.

Abb. 6a.

Curarekonzentration erneut eine totale Curarisierung erreicht wird, so bleibt eine zweite Prostigminapplikation wirkungslos (Abb. 6b). Dieses in mehreren Versuchen festgestellte Verhalten zeigt, daß Prostigmin am Wirkort zäh haftet und nur wenig auswaschbar ist.

In Abb. 7 ist ein Versuch dargestellt, in dem die Dosiswirkungskurve von d-Tubocurarin vor und nach maximaler Prostigminwirkung verglichen wurde. Die annähernd parallele Verschiebung der Kurve um $\log 2$ nach rechts bedeutet, daß *nach* Prostigmin für den gleichen Curarisierungsgrad die doppelte Curarekonzentration erforderlich ist.

Diese Verschiebung ist relativ gering. Nach Abb. 4 ist die vollständig curarisierende Tubarinkonzentration sicher mehr als viermal höher als die Schwellenkonzentration. Es ist also zu erwarten, daß eine vollständige Curarisierung durch Prostigmin nicht ganz aufzuheben ist, was mit unseren Erfahrungen durchaus übereinstimmt. Schließlich sei erwähnt, daß es Präparate gibt, bei denen Prostigmin trotz guter Ringerreversibilität überhaupt keinen Curareantagonismus erkennen läßt.

d) Prostigmin als curarisierendes Agens

Es ist bekannt, daß sehr viele Verbindungen mit quaternären Ammoniumgruppen curarisierend wirken können. Abb. 8 zeigt, daß dies auch für Prostigmin gilt, allerdings erst von der sehr hohen Konzentration von etwa $5 \cdot 10^{-4}$ an. Prostigmin 10^{-3} wirkt ungefähr gleich wie d-Tubocurarin $5 \cdot 10^{-6}$.

Es ist bemerkenswert, daß Prostigmin als curarisierendes Agens ohne weiteres auswaschbar ist, ganz im Gegensatz zu Prostigmin als anticurarisierendes Agens (s. Abschnitt c).

e) Calciumüberschuß

Feng (4) hat gezeigt, daß ein sehr großer Calciumüberschuß (ca. fünffache Ringerkonzentration = 0,1% CaCl_2)

Abb. 6a. Prostigmin als Curareantidot. Partielle Regeneration der indirekten Hubhöhen durch Prostigmin $4 \cdot 10^{-6}$.

Abb. 6b. (Fortsetzung von 6a) Protrahierter Effekt von Prostigmin: d-Tubocurarin $2,5 \cdot 10^{-6}$ wirkt nur mehr partiell curarisierend. Die zweite Prostigminapplikation bleibt wirkungslos. Näheres siehe Text.

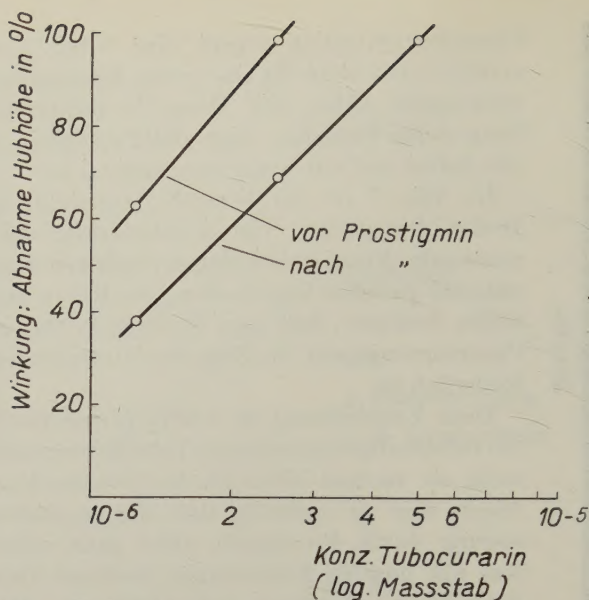


Abb. 7. Verschiebung der Dosiswirkungskurve durch Prostigmin nach rechts, d. h. zur Erzielung gleicher Wirkung ist eine höhere d-Tubocurarin-konzentration erforderlich.

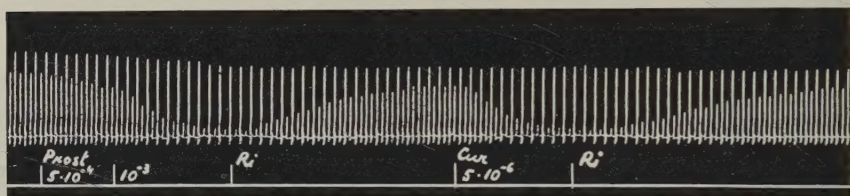


Abb. 8. Curarisierender Effekt hoher Prostigminkonzentrationen ($5 \cdot 10^{-4} + 10^{-3}$).

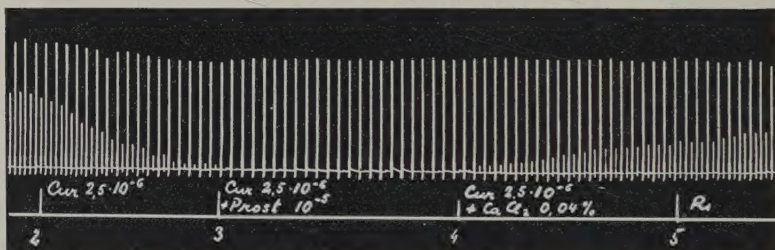


Abb. 9a. Curareantagonistischer Effekt von CaCl_2 (0,04%) bei prostigminrefraktärem Präparat.

am Nervmuskelpreparat der Kröte anticurarisierend wirkt. Wir haben uns die Frage gestellt, ob auch geringere Calciumüberschüsse ähnlich wirken. Dies ist tatsächlich der Fall (Abb. 9a). Schon 0,04% CaCl_2 (also zweifache Ringerkonzentration) genügt, um einen ausgeprägten Curareantagonismus

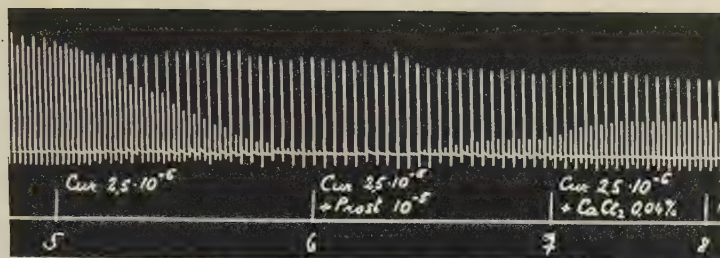


Abb. 9b. Potenzierung des curareantagonistischen Effekts von Prostigmin (10^{-5}) durch CaCl_2 (0,04%).

zu erzielen. Calcium wirkte regelmäßiger als Prostigmin, bzw. auch dann, wenn Prostigmin versagt. Ferner kann Calcium den maximalen Prostigmin-effekt potenzieren, was auf die Verschiedenheit der Angriffsorte der beiden Pharmaka hinweist (Abb. 9b).

Diskussion

Die von Dale und seiner Schule (5) geäußerte und experimentell wahrscheinlich gemachte Vorstellung, daß Acetylcholin als Reizvermittlerstoff an der neuromuskulären Synapse eine wesentliche Rolle spielt, ist heute als Arbeitshypothese weitgehend anerkannt. Dies führt dazu, daß die Curarisierung als «competitive inhibition» von Stoffen mit quaternärem Stickstoff aufgefaßt werden kann. Damit ist verständlich, daß auch Prostigmin einen curarisierenden Effekt hat.

In unsern Untersuchungen allerdings blockiert Prostigmin die indirekte Erregbarkeit nur in der hohen Konzentration von 10^{-3} , die 200mal größer ist als die curareantagonistisch wirksame Prostigminkonzentration. Dies steht in auffallendem Widerspruch zu den Befunden anderer Autoren. Chase und Mitarb. (6) finden mit der Head-drop-Methode am Kaninchen, daß, während 0,05 mg/kg Prostigmin anticurarisierend wirkt, bereits 0,12 mg/kg lähmt und zu Head-drop führt. Rosenblueth und Mitarb. (7) geben sonderbarerweise sogar an, daß 0,3–1 mg/kg i.v. bei der Katze zu Lähmungen führt, dieselbe Prostigmindosis aber, nach Curare gegeben, zu einer Regeneration der indirekten Hubhöhen führt. Möglicherweise beruht diese offensichtliche Diskrepanz mit unsern Ergebnissen darauf, daß Warmblütler durch Prostigmin leichter curarisiert werden als Kaltblütler.

Die Vorstellung, daß Prostigmin in geringen Konzentrationen durch Hemmung der Cholinesterase (8) anticurarisierend wirkt, ist in jüngster Zeit durch die Feststellung, daß anticurarisierende und cholinesterasehemmende Wirkung verschiedener Prostigminhomologen parallel gehen, weiter gestützt worden (9). Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß Prostigmin als anticurarisierendes Agens schlecht auswaschbar ist (im Gegensatz zu Prostigmin als curarisierendes Agens). Dies steht in Ein-

klang mit den Ergebnissen von *Easson* und *Stedman* (8), die gefunden haben, daß sich das Gleichgewicht: Esterase + Prostigmin $\rightleftharpoons$ Esterase-Prostigmin in vitro langsam einstellt und nach der Seite des Esterase-Prostigmin-Komplexes verschoben ist. Damit ist die schlechte Auswaschbarkeit von Prostigmin ohne weiteres verständlich.

Im Hinblick auf die anticurarisierende Wirkung von Calcium stellt sich die Frage, ob Calcium i.v. als Curareantidot, eventuell in Kombination mit Prostigmin, in der Klinik zu verwenden wäre. Diese Frage ist um so berechtigter, als übereinstimmend mit unseren Ergebnissen aus einer Arbeit von *Wilson* und *Wright* (10) hervorgeht, daß Prostigmin als Curareantidot auch am Warmblütler manchmal unwirksam sein kann. Zunächst müßte natürlich der Curare-Calcium-Antagonismus am Warmblütler untersucht werden, aber es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß *Curschmann* (11) bei seltenen prostigminrefraktären Myastheniepatienten die Kombination von Prostigmin mit Calcium per os mit Erfolg verwendet hat.

Zusammenfassung

Mit Hilfe alternierender direkter und indirekter Reizung am perfundierten Schenkelpräparat des Frosches wird eine Methode entwickelt, mit der pharmakologische Effekte an der motorischen Endplatte in quantitativer Weise erfaßt und registriert werden können.

d-Tubocurarin (Tubarine) wird untersucht. Die log. Konzentrationswirkungskurve ergibt angenähert eine Gerade.

Verschiedene Curarepräparate sind untereinander vergleichbar. Als Beispiel wird gezeigt, daß Kondrocurare ca. fünfmal schwächer wirksam ist als d-Tubocurarin.

Der anticurarisierende Effekt kleiner Prostigminkonzentrationen ist quantitativ darstellbar als Verschiebung der log. Konzentrationswirkungskurve in Richtung höherer Curarekonzentration.

Sehr große Prostigminkonzentrationen wirken curarisierend. Prostigmin als anticurarisierendes Agens ist schlecht, als curarisierendes Agens gut auswaschbar.

Calciumüberschuß wirkt anticurarisierend und kann, nach Prostigmin gegeben, den Effekt des letzteren steigern.

1. *Bovet, D., und Bovet, F.*: Exper. **4**, 325 (1948). – 2. *Holaday*: Zit. nach Wintersteiner, O., und Dutcher, J. D.: Science **97**, 467 (1943). – 3. *Chou, T. C.*: Brit. J. Pharmacol. **2**, 1 (1947). – 4. *Feng, T. P.*: Chinese J. Physiol. **10**, 513 (1936). – 5. *Dale, H. H., Feldberg, W., und Vogt, M.*: J. Physiol. **86**, 353 (1936). – 6. *Chase, H. F., Schmidt, J. L., und Bhattacharya, B. K.*: J. Pharmacol. (Am.) **91**, 236 (1947). – 7. *Rosenblueth, A., Lindsley, D. B., und Morison, R. S.*: Amer. J. Physiol. **115**, 53 (1936). – 8. *Easson, L. H., und Stedman, E.*: Proc. roy. Soc. B **121**, 142 (1936). – 9. *Blaschko, H., Bülbiring, E., und Chou, T. C.*: Brit. J. Pharmacol. **4**, 29 (1949). – 10. *Wilson, A. T., und Wright, S.*: Quart. J. expr. Physiol. **26**, 127 (1936). – 11. *Curschmann, H.*: Med. Welt, Nr. 1 (1943).

